副干酪乳杆菌β-葡萄糖苷酶的表达、纯化及酶学性质研究

谢玉锋[1, 2]，韩雪梅[1]，路福平[1]

（1. 省部共建食品营养与安全国家重点实验室，天津科技大学生物工程学院，天津 300457；

2. 哈尔滨学院食品工程学院，哈尔滨 150086）

摘　要：为了实现糖苷类物质的高效转化，将来源于副干酪乳杆菌（*Lactobacillus paracasei*）TK1501β-葡萄糖苷酶基因连接于表达载体 pET28a(+)上，在 *E. coli* BL21 中表达，重组酶经镍离子亲和层析分离得到纯酶，其相对分子量和比酶活分别为 86.63 kDa 和 675.56 U/mg。最适作用温度和 pH 分别为 30 ℃和 6.5。 Mg^{2+}和 Ca^{2+}对β-葡萄糖苷酶酶活抑制作用最小，Cu^{2+}几乎使其丧失催化活性。其底物特异性较宽泛，对大豆异黄酮、栀子苷、水杨苷、七叶苷、虎杖苷、熊果苷均有降解作用。以β-pNPG 为底物时，该酶的 K_m 和 V_{max} 分别为 1.44 mM 和 58.32 mM s^{-1}，催化系数 k_{cat} 为 3982 s^{-1}。结果与分析表明来源于副干酪乳杆菌 TK1501β-葡萄糖苷酶对水解大豆异黄酮和合成糖苷将会发挥重要作用。

关键词：副干酪乳杆菌　β-葡萄糖苷酶　纯化　酶学性质

中图分类号：　　　　**文献标志码：**　　　　**文章编号：**

Expression, Purification and Enzymatic Properties of β-glucosidase from *Lactobacillus paracasei*

XIE Yufeng[1, 2]，HAN Xuemei[1]，LU Fuping[1]

(1.State Key Laboratory of Food Nutrition and Safety, College of Biotechnology, Tianjin University of Science & Technology, Tianjin 300457, China；

2. College of Food Science and Engineering, Harbin University, Harbin 150086,China)

Abstract: To improve the conversion efficiency of glucoside to small molecule compounds, the gene encoded β-Glucosidase from *Lactobacillus paracasei* TK1501 was inserted into pET28a(+), and further transformed into *E. coli* BL21(DE3) for heterologous expression. The recombinant enzyme, which purified by Nickel affinity chromatography, is conferred with the high specific activity of 675.56 U/mg, and the molecular weight of 86.63 kDa.. The biochemical characterization of this recombinant enzyme shows that it exhibit the highest bio-activity in 30 ℃ and pH of 6.5, and the β-glucosidase activity was barely inhibited by Mg^{2+} and Ca^{2+}, but largely by Cu^{2+} with even no catalytic activity. It was also found that this enzyme possess a broad substrates specificity toward genistin, daidzin, daidzein, geniposide, salicin, heptosporin, polydatin and arbutin. Finally, The kinetics characteristics shows that K_m and V_{max} of this enzyme are 1.44 mM and 58.32 mM s^{-1}, respectively, and the catalytic coefficient (k_{cat}) is 3982 s^{-1} using β-pNPG as the substrate. The all results above show that the β-Glucosidases from *Lactobacillus paracasei* TK1501 play important roles in the process of hydrolysis of soybean isoflavone and synthesis of glycosides.

Key words: *Lactobacillus paracasei*　β-glucosidase　purification　enzymatic properties

β-葡萄糖苷酶（β-Glucosidases EC 3.2.1.21），属于水解酶类，又称β-D-葡萄糖苷水解酶。它可以催化水解结合于末端非还原性的β-D-糖苷键，同时释放出配基与葡萄糖[1]。β-葡萄糖苷酶还可以催化合成烷基糖苷，烷基糖苷可用作治疗剂、诊断工具、益生菌的生长促进剂和表面活性剂等[2]。由于酶法反应条件温和、产物纯、易分离等优点而逐渐被人们选择。因此β-葡萄糖苷酶在合成糖苷及天然产物的改造中都发挥着极其重要的作用。β-葡萄糖苷酶可以将大分子大豆异黄酮降解为生物活性更高的大豆苷元[3-8]。大豆异黄酮苷元对缓解心脑血管疾病、糖尿病和骨质疏松症有一定效果[9]。郑芳芳[2]等人对来源于链霉菌 GXT6 的β-葡萄糖苷酶进行了分子改造，研究结果表明对天然底物甜茶苷、黄豆苷、染料木苷、虎杖苷和淫羊藿苷具有水解功能，但合成烷基糖苷的能力不强。β-葡萄糖苷酶基因在外源宿主中的克隆与表达，可以通过增加基因拷贝数来提高其表达量，并且有利于深入了解和分析其基因信息，为改变目的蛋白的催化特性和提高基因表达效率等分子

基金项目：宁夏回族自治区重点研发计划(2018BBF02008);国家级大学生创新创业训练计划(201810234004)

作者简介：谢玉锋（1981—），男，河南漯河人，博士研究生；**通信作者：**路福平，教授，lfp@tust.edu.cn

生物学操作提供理论依据。

大肠杆菌作为研究最为成熟的重组蛋白克隆和表达载体已得到广泛应用，通过质粒上融合标签的引入都便于目的酶的分离纯化和酶学性质研究[10-13]。并且，外源蛋白在大肠杆菌中的高效表达可以为该酶的定向进化和定点突变等蛋白质工程研究提供理想的原始材料和操作体系，为进一步研究其蛋白结构与功能关系提供理论依据。近年来，李娟[14]报道了从匍枝根霉基因组 DNA 中扩增得到 β-葡萄糖苷酶 bgl3 全长基因，并在大肠杆菌 BL21 中实现高效表达。闫青[15]提取黑曲霉 3.316 基因组 DNA，以其为模板利用 PCR 技术扩增得到大小为 2080 bp 的 bgl 基因，并对其核苷酸和氨基酸序列以及可能编码的蛋白质结构进行了分析，根据其结构并结合相关文献对其活性位点和耐热机理进行探究。钱利纯[16]等在试验中采用 Trizol 法提取总 RNA，以反转录出的 cDNA 为模板进行 PCR 扩增，得到大小为 2583 bp 的 bgl 基因，编码 860 个氨基酸，理论分子量为 93.2 kDa，理论等电点为 4.45，并进行序列测定及结构预测。

目前β-葡萄糖苷酶存在活力不高，底物作用不宽泛，并且酶源也存在着不适用于食品生产等问题。因此开发来源于可用于食品生产的菌株，具有高活力且底物特异性宽泛的β-葡萄糖苷酶具有重要意义。

本研究主要从副干酪乳杆菌 TK1501 中分离出 β–葡萄糖苷酶，并对该酶的酶学性质进行研究，为β-葡萄糖苷酶催化大豆异黄酮水解生成大豆异黄酮苷元提供理论依据和更多的酶源。

1　材料与方法

1.1　**菌种与试剂**

副干酪乳杆菌，pET28a (+)，*E. coli* BL21(DE3)均为本实验室保藏，质粒小量快速提取试剂盒、DNA 胶纯化回收试剂盒、BCA 蛋白浓度试剂盒、LB 培养基。

1.2　**方法**

1.2.1 *产β–葡萄糖苷酶工程菌的构建*

以副干酪乳杆菌 TK1501 基因组为模板，PCR 扩增β–葡萄糖苷酶（*GLU*），酶切、连接，热击转化至大肠杆菌 BL21(DE3)，比对测序结果与 NCBIβ–葡萄糖苷酶基因序列是否一致。

1.2.2 *β–葡萄糖苷酶的表达及纯化*

培养产β–葡萄糖苷酶工程菌，低温诱导，离心收集菌体，使用 Ni-NTA superflow 对目标蛋白进行亲和层析纯化。用丙烯酰胺凝胶电泳（SDS-PAGE）检测表达产物，用 BCA 法测定蛋白的浓度。

1.3　**β–葡萄糖苷酶酶学性质**

1.3.1 *β-葡萄糖苷酶活力测定*

准确量取 100 μL 酶液加 5 mmol/L β-pNPG 500 μL 在 37 ℃培养 30 min，加 0.2 mol/L 碳酸钠 250 μL 终止反应。410 nm 下测定吸光度，以此检测β-葡萄糖苷酶酶活。

1.3.2 *酶最适反应温度和热稳定性的测定*

最适温度测定，在不同温度(20~60 ℃)下测定β-葡萄糖苷酶比酶活，以比酶活最高者为 100 %。将β-葡萄糖苷酶在不同温度下保温 1 h 后，迅速冷却至 0 ℃，测定酶的残余酶活力，以未保温的酶液比酶活为 100 %。

1.3.3 *酶最适反应 pH 和 pH 稳定性的测定*

分别用浓度为 20 mM 的磷酸氢二钠柠檬酸缓冲液，以酶活最高者为 100 %。此外，将酶液用不同 pH 值缓冲液稀释，在 4 ℃下放置 1 h 后，测定其残余酶活力，以未保温酶液的酶活力为 100 %。

1.3.4 *金属离子对酶活力的影响*

配制 0.1 mol/L 不同金属离子溶液，按 1/1000 的体积比加入到酶液中，使酶液中金属离子的终浓度为 0.1 mmol/L，4 ℃保温加入 60 min，在最适条件下测定酶活力，以不加金属离子的酶活为 100 %。

1.3.5 *酶动力学研究*

配制底物的浓度，使其为 0.59、1.47、2.94、4.41、5.88、8.82、11.76、14.71 mmol/L，依次在最适反应条件下测定酶活力，通过 Lineweaver-Burk 双倒数法求得 V_{max} 及 K_m，最后根据反应体系酶浓度计算 k_{cat}。

1.3.6 *酶底物选择性研究*

将豆浆中的大豆异黄酮（染料木苷、黄豆苷、黄豆黄苷）替换为等浓度其他底物：栀子苷、水杨苷、虎

杖苷、七叶苷、熊果苷，然后测定酶对不同底物的催化活性。

1.4 β–葡萄糖苷酶降解和合成反应

1.4.1 β-葡萄糖苷酶降解反应

以 0.12 mmol/L 终浓度的染料木苷与纯酶在 37 ℃下反应 12 h，对水解产物进行 HPLC 分析，进而计算转化率。

1.4.2 β-葡萄糖苷酶合成反应

分别在 20 %葡萄糖溶液中加入 10 % (V/V)的甲醇、乙醇、异丙醇、己醇和纯酶，在 37°C 条件下反应 12 h，对合成产物进行 HPLC 分析，并计算转化率。

2 结果与讨论

2.1 产β–葡萄糖苷酶工程菌的构建

以副干酪乳杆菌 TK1501 的基因组 DNA 为模板，应用已设计好的相应引物进行 PCR 扩增，得到 DNA 片段，如图 1，*GLU* 基因大小为 2388 bp，扩增产物 DNA 的大小与预期相符。

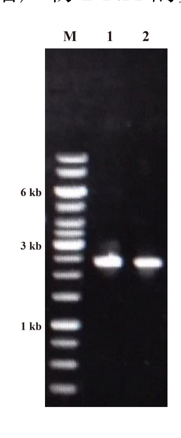


图 1 β –葡萄糖苷酶基因 PCR 产物的鉴定

Fig. 1 Identification of PCR amplify

M： Marker；1，2：β-葡萄糖苷酶基因（gene of β-glucosidase）

对菌落 PCR 筛选的转化子，提取质粒进行单双酶切验证，结果如图 2，经过单酶切的 DNA 分子量约为 8 kb，即表达载体 pET28a 与基因 *GLU* 分子量之和，经过双酶切得到两条条带，分别是线性化 pET28a 与基因 *GLU*，证明该转化子验证正确。

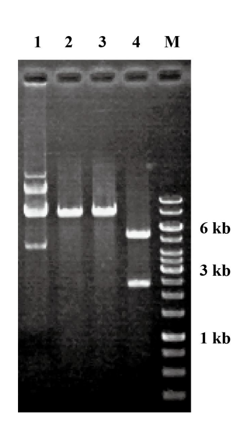


图 2 酶切验证重组质粒

Fig. 2 Identification of recombinant plasmids digested with *Hin*d III and *Xho*I

M： Marker；

1：pET-GLU 重组质粒

（pET-GLU recombinant plasmids）；

2，3：pET-GLU 经 *Hin*d III/*Xho*I 单酶切；

（pET-GLU digested with *Hin*d III/*Xho*I）

4：pET-GLU 经 *Hin*d III 和 *Xho*I 双酶切

（pET-GLU digested with *Hin*d III and *Xho*I）

2.2 β–葡萄糖苷酶 GLU-1 的诱导表达及纯化

工程菌 *E. coli* BL21(pET-XynG1-1)在 37 ℃、180 r/min 培养 2.5 h 至 OD_{600} nm=0.85，加入 IPTG 至终浓度为 1 mmol/L，在 20 ℃、100 r/min 条件下诱导 16 h，收集发酵液，并制备样品，分别对重组菌的胞外蛋白和胞内蛋白进行比酶活力测定，测得其胞外酶活只有 1.47 U/mg，而胞内酶活为 48.25 U/mg，大部分的重组蛋白在胞内存在，并且载体 pET28a(+)在多克隆位点的 N 端有 His 标签，应用 Ni^{2+}亲和层析对重组蛋白进行纯化，纯化后的 *GLU-1* 经 SDS-PAGE 检测为单一条带，如图 3，测定该纯酶的比活力为 675.56 U/mg，纯化倍数为 14 倍。

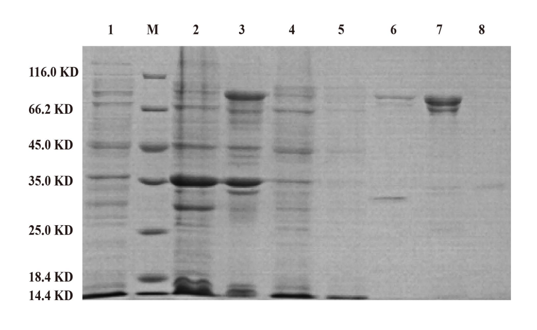


图 3 纯化 GLU-1 的 SDS-PAGE

Fig. 3 SDS-PAGE of purified GLU-1

M: Marker; 1: whole cell liquor induced at 0.1 mmol/L IPTG; 2: supernatant; 3: precipitant;

4: flowthrough; 5: binding buffer; 6: washing buffer; 7: elution buffer; 8: resin after elution

2.3 β–葡萄糖苷酶酶学性质研究

2.3.1 温度对β-葡萄糖苷酶催化活性和稳定性的影响

当温度升高时，一方面分子热运动加快，相似于化学反应，其反应速率加快；另一方面，温度升高会使酶变性失活，反应速率会下降，温度对于酶促反应的影响是这两个方面综合表现。

在不同反应温度下，按测定β-葡萄糖苷酶和蛋白质的方法测定β-葡萄糖苷酶的比酶活，以测定条件中比酶活最大值定义为 100 %，计算相对酶活，作温度-相对酶活力曲线，以确定酶的最适反应温度。

β-葡萄糖苷酶的反应温度对酶活力影响如图 4a 所示，重组β-葡萄糖苷酶的最适反应温度为 30 ℃，在 20-40 ℃之间，相对酶活可保持在 70 % 以上，当反应温度高于 50 ℃时，相对酶活力下降至最高酶活力的 40 %以下。

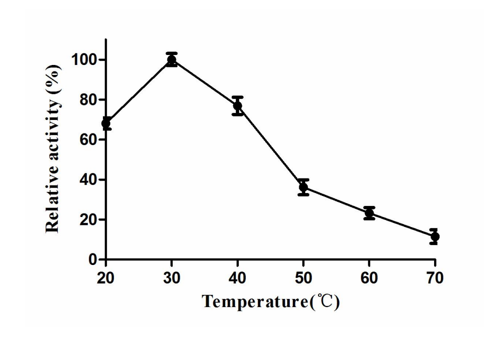


图 4a 温度对β-葡萄糖苷酶的酶活力影响

Fig. 4a Effect of temperature on β-glucosidase activity

The activity of β-glucosidase toward β-pNPG in optimal condition is represented as 100 %

酶的温度稳定性，酶在不同温度下保温 60 min 之后取出，迅速将样品冰浴冷却，以未处理的样品酶活力定为 100 %，计算相对残余酶活，作温度对酶活力曲线。温度稳定性结果如图 4b 所示，在不同温度下保温 60 min 以后，随着温度升高，相对酶活力越来越低。在 20 ℃-30 ℃时，相对酶活力高达 80 %，稳定性良好，但是高于 40 ℃，残留酶活力降至 20 % 以下，50 ℃酶活力基本为 0，表明该酶对高温的耐受性较差。

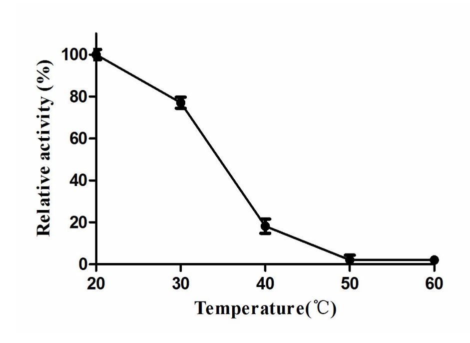


图 4b β-葡萄糖苷酶的热稳定性

Fig. 4b Thermo stability of β-glucosidase

The activity without preincubation is represented as 100 %

2.3.2 pH 对β-葡萄糖苷酶催化活性和稳定性的影响

过酸或者过碱会破坏酶的空间结构或者引起酶构象改变，导致酶活力下降。当 pH 变化不剧烈时，酶虽未变性，但可能影响底物与酶的结合和解离，从而影响酶的催化活性。

分别用浓度为 20 mmol/L 的磷酸盐缓冲液(pH 6.0-8.0)、醋酸盐缓冲液 (pH 5.0-6.0)、测定β-葡萄糖苷酶比酶活，将酶活力最高者定为 100 %，计算不同 pH 下的相对酶活，作 pH-相对酶活力曲线，以确定酶的最适反应 pH。

如图 5a，磷酸盐缓冲液 pH=6.5 时，酶活力最高， 以其为最高相对酶活 100 %，pH 高于 7.5 时，酶活力下降为 30 %以下。pH 低于 6.5 时，酶活力下降趋势不明显。其最适作用 pH 为 6.5。

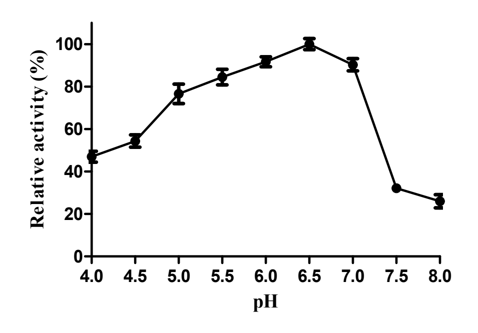


图 5a pH 对β-葡萄糖苷酶的酶活力影响

Fig. 5a Effect of pH on β-glucosidase activity

The activity of β-glucosidase toward β-pNPG in optimal condition is represented as 100 %

β-葡萄糖苷酶对 pH 都有一定的耐受性，如图 5b 所示。

经过 1 h、4 ℃的保温后，pH 在 5.5-7.5 之间时，相对酶活都保持在 85 %以上，表明该酶活性在此 pH 范围内稳定性良好；pH=8.5 处理 1 h 后β-葡萄糖苷酶的残余酶活约为 65 %。pH=6.5 处理 1 h，残余酶活最高，

与其最适反应 pH 保持一致。

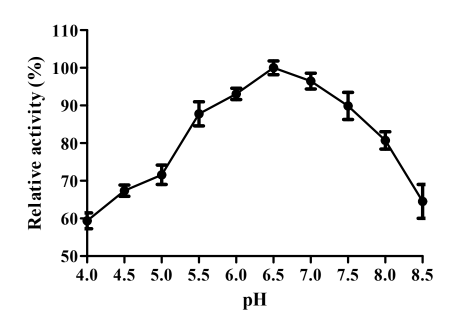


图 5b β-葡萄糖苷酶的 pH 稳定性

Fig. 5b pH stability of β-glucosidase

The activity without preincubation is represented as 100 %

2.3.3 金属离子对β-葡萄糖苷酶酶活的影响

金属离子以多种方式参与催化，如与底物结合，促进底物在反应中的正确定向；作为 lewis 酸接受电子，增强亲核基团的亲核性；作为亲电催化剂，稳定过渡态中间物中的电荷；通过价态的可逆变化，作为电子的受体或供体，参与氧化还原反应等。金属离子通常能作为酶的辅因子而对其活力产生重要影响。研究了几种金属离子，包括：Mg^{2+}、Cu^{2+}、Fe^{2+}、Fe^{3+}、Ca^{2+}、Zn^{2+}、Mn^{2+}对β-葡萄糖苷酶酶活力的影响，结果如图 6 所示。

Mg^{2+}和 Ca^{2+}对β-葡萄糖苷酶酶活抑制作用最小，其余金属离子均有不同程度的抑制。Cu^{2+}几乎使β-葡萄糖苷酶丧失催化活性，可能抑制了酶催化反应中心关键氨基酸残基的电子传递。

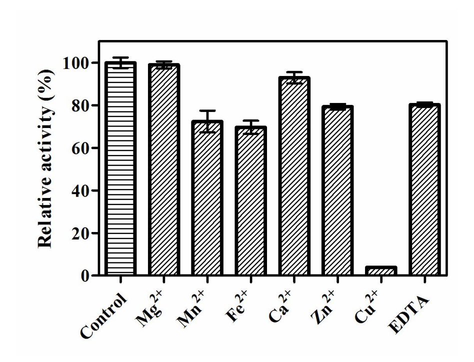


图 6 金属离子对β-葡萄糖苷酶酶活的影响

Fig. 6 Effects of metal ions on β-glucosidase activity

Metal ions were added at the final concentrations of 1mmol/L.

The activity of β-glucosidase toward β-pNPG without metal is represented as 100 %

2.3.4 β-葡萄糖苷酶动力学研究

配制不同浓度的β-pNPG 溶液，在最适反应条件下测定β-葡萄糖苷酶的酶活，双倒数法作图，计算该酶的动力学参数，包括：米氏常数（*K*m）和最大反应速率(*V*max)。β-葡萄糖苷酶的动力学性质能用米氏方程进行很好的描述，与其他学者研究报道的β-葡萄糖苷酶通常能用米氏方程进行描述相一致。酶的动力学曲线如图 7 所示。

测定不同反应底物浓度下，酶的催化反应速率。采用双倒数作图（Lineweaver-Burk 法），绘制β-葡萄糖苷酶的动力学曲线。计算得出，K_m=1.44 mM，最大反应速度 V_{max}=58.32 mM s^{-1}，催化系数 k_{cat}=3982 s^{-1}。

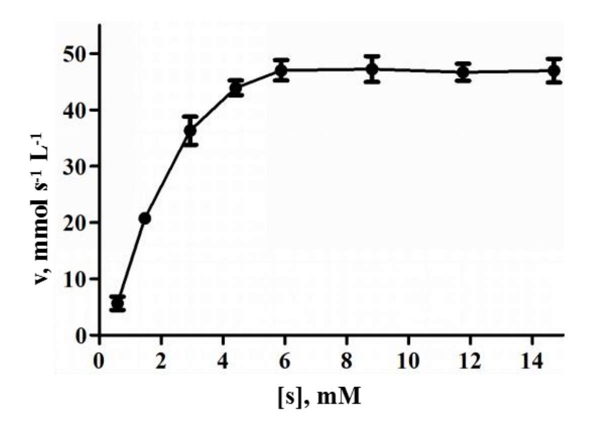


图 7 β-葡萄糖苷酶的动力学曲线

Fig. 7 Substrate saturation curves of β-glucosidase

2.3.5 酶的底物选择性研究

分别配制栀子苷、水杨苷、七叶苷、虎杖苷、熊果苷的底物溶液，检测β-葡萄糖苷酶对各个底物的特异性。结果如图 8-1，8-2 和表 1 所示。

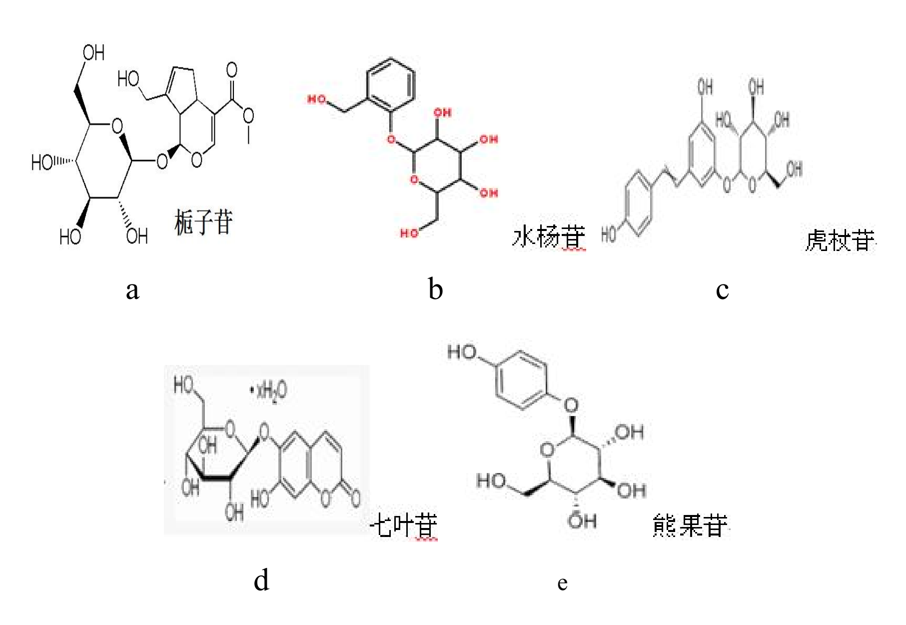


图 8-1 底物结构式

Fig. 8-1 Structures of substrates

a：栀子苷；b：水杨苷；c：虎杖苷；d：七叶苷；e：熊果苷；

a：Geniposide；b：Salicin；c：Polydatin；d：Heptaside；e：Arbutin；

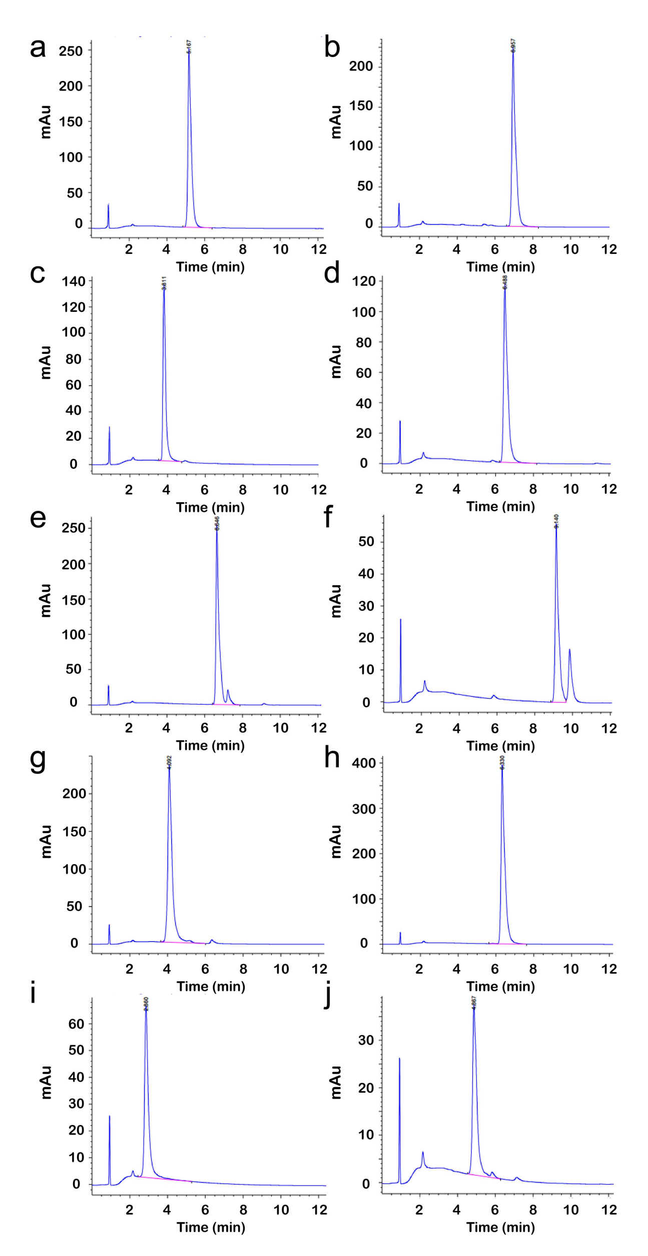


图 8-2 底物选择性高效液相图

Fig. 8-2 HLPC chromatogram of the specificity of substrates

a：栀子苷空白样品(sample of Geniposide) b：栀子苷酶解样品(Hydrolyzed sample of Geniposide)

c：水杨苷空白样品(sample of Salicin) d：水杨苷酶解样品(Hydrolyzed sample of Salicin)

e：虎杖苷空白样品(sample of Polydatin) f：虎杖苷酶解样品(Hydrolyzed sample of Polydatin)

g：七叶苷空白样品(sample of Heptaside) h：七叶苷酶解样品(Hydrolyzed sample of Heptaside)

i：熊果苷空白样品(sample of Arbutin) j：熊果苷酶解样品(Hydrolyzed sample of Arbutin)

表 1 不同底物的β-葡萄糖苷酶动力学参数

Table 1 Kinetic parameters of β-glucosidase toward different substrates

底物	K_m (mM)	k_{cat} (s^{-1})	k_{cat}/K_m (mM^{-1} s^{-1})	相对酶活（%）
pNPG	1.44±0.08	3982±14	2765	100
Geniposide	2.87±0.05	2520±23	878	35±1.5
Salicin	2.25±0.01	2973±88	1320	47±1.8
Polydatin	5.71±0.10	1728±45	302	16±0.6
Heptaside	3.61±0.08	2207±38	611	25±0.9
Arbutin	1.92±0.03	3569±72	1858	52±1.4

研究结果发现，除黄豆苷、染料木苷、黄豆黄苷外，β-葡萄糖苷酶还能降解水杨苷、栀子苷、虎杖苷、七叶苷。栀子苷糖苷键连接双环酚苷、水杨苷和虎杖苷糖苷键连接醇苷、七叶苷糖苷键连接酚苷、熊果苷糖苷键连接芳香苷，由于其连接集团的复杂程度不同导致代表其底物结合能力不同的 K_m 值也有所不同。其底物对糖苷键连接基团作用范围较为宽泛。

2.4 β–葡萄糖苷酶降解和合成反应

经染料木苷和甲醇、乙醇、异丙醇、己醇分别与纯酶反应检测及计算，实验结果如图 9 所示。

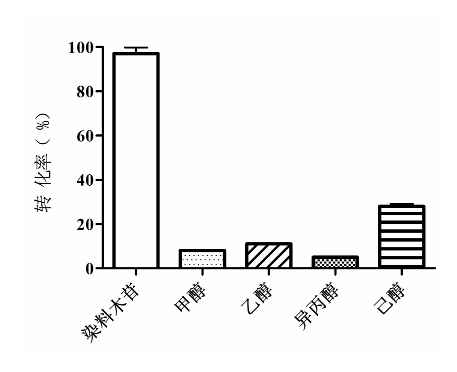


图 9 β-葡萄糖苷酶**水解和合成反应对比**

Fig. 9 Comparison of hydrolysis and synthesis with β-glucosidase

由图 9 可知，β-葡萄糖苷酶降解染料木苷生成金雀异黄酮的转化率为 97 %，而合成烷基糖苷的转化率最高的己基糖苷转化率仅为 28 %，可以看出β-葡萄糖苷酶催化水解反应生成苷元的酶活远大于合成烷基糖苷的酶活，说明在β-葡萄糖苷酶发挥酶作用的主要是水解作用。

3 结论

以副干酪乳杆菌 TK1501 为供体菌，在 *E. coli* BL21 中克隆得到了表达，获得重组酶经镍离子亲和层析分离得到纯酶，其比酶活较高，为 675.56 U/mg，纯化倍数为 14 倍；最适作用温度和 pH 分别为 30 ℃和 6.5。Mg^{2+} 和 Ca^{2+}对β-葡萄糖苷酶酶活抑制作用最小，Cu^{2+}几乎使其丧失催化活性。以β-pNPG 为底物时，该酶的 K_m 和 V_{max} 分别为 1.44 mM 和 58.32 mM s^{-1}，催化系数 k_{cat} 为 3982 s^{-1}。在底物选择性上，除黄豆苷、染料木苷、黄豆黄苷外，还能降解水杨苷、栀子苷、虎杖苷、七叶苷，底物作用范围较为宽泛。

自上世纪 70 年代以来，已有细菌来源的 GH3 家族β-葡萄糖苷酶基因被克隆并表达于大肠杆菌系统中。

赵云等[17]人以多粘类芽孢杆菌为供体菌，在 *E. coli* BL21 中克隆得到了表达，初步纯化后重组酶比酶活为 24.7 U/mg。商永梅等[12]人以类芽孢杆菌为供体菌，在 *E. coli* BL21 中克隆得到了表达，初步纯化后其重组酶比酶活为 453.12 U/mg。Maekawa 等[18]人纯化来源于多头绒泡菌的重组β-葡萄糖苷酶的比酶活为 27.8 U/mg。江民华等[13]人以差异柠檬酸杆菌为供体菌，在 *E. coli* M15 中克隆得到了表达，表达产物对甜菊苷、黄豆苷和染料木苷有一定的水解作用。王锐丽[3] 以嗜热乙醇菌为供体菌，在 *E. coli* JM109 中克隆得到了表达，表达产物对染料木苷具有较好的水解作用。而得自副干酪乳杆菌 TK1501 的β-葡萄糖苷酶从比酶活和水解宽泛性较具优势。

近些年来，对β-葡萄糖苷酶的相关研究虽然取得了很大进展，但对于其结构和相关酶学性质之间的关系仍不明确，酶活力还有待于提高，这些都是今后研究的方向。此外很多产酶菌种用于食品生产存在食品安全方面的安全隐患，因此在食品加工中的使用受到限制。对能用于食品生产副干酪乳酸菌产生的β-葡萄糖苷酶应用于大豆异黄酮的酶解过程中，制备生物活性更高的大豆异黄酮苷元，为β-葡萄糖苷酶的开发和应用提供了更大范围的酶源。

参考文献：

[1]James R，Bancha M，Supaporn B，et al．β-Glucosidases: Multitasking，moonlighting or simply misunderstood．Plant Science，2015，24(1)：246-259．

[2]郑芳芳，王金佩，林宇，等．链霉菌 GXT6 β-葡萄糖苷酶的酶学性质及葡萄糖耐受性分子改造．微生物学报，2018，58(10)：1839-1852．

[2]Zheng Fangfang，Wang Jinpei，Linyu，et al．Characterization of β-glucosidase from *Streptomyces* sp. GXT6 and its molecular modification of glucose tolerance．Acta Microbiologica Sinica，2018，58(10)：1839-1852．

[3]王锐丽．嗜热菌β-葡萄糖苷酶 A 水解大豆异黄酮的研究 ．安徽农学通报，2016，22(18)：26-28．

[3]Wang Ruili．Hydrolysis of Soybean Isoflavone by β-Glucosidases A from *Thermoanaerobacter etholicus*．Anhui Agricultural Science Bulletin，2016，22(18)：26-28．

[4]Messina M，Erdman J，Setchell KD．Introduction to and perspectives from the Fifth International Symposium on the role of soy in preventing and treating chronic disease．The Journal of nutrition，2004，134(5)：1205S-1206S．

[5] Tsangalis D，Ashton J，McGill A，et al．Biotransformation of isoflavones by bifidobacteria in fermented soymilk supplemented with D-glucose and L-Cysteine．Journal of Food Science，2003，68(2)：623-631．

[6]Messina M．Soy foods, isoflavones, and the health of postmenopausal women．The American Journal of Clinical Nutrition，2014，100：423S-430S．

[7]Chun J，Kim GM，Lee KW，et al．Conversion of isoflavone glucosides to aglycones in soymilk by fermentation with lactic acid bacteria．Journal of Food Science，2007，72(2)：M39-M44．

[8]Hati S，Vij S，Singh BP，et al．β-Glucosidase activity and bioconversion of isoflavones during fermentation of soymilk．Food Research International，2015，95：216–220．

[9]孙国祥，吴美仙．β-葡萄糖苷酶水解结合型大豆异黄酮参数相关性研究．浙江海洋学院学报(自然科学版)，2014，33(03)：284-289．

[9]Sun Guoxiang，Wu Meixian．Correlation Study on parameters of hydrolysis soy isoflavones and β-Glucosidases． Journal of Zhejiang Ocean University (Natural Science)，2014，33(03)：284-289．

[10] Mergulhaoa FJ，Summersb DK，Monteiro GA．Recombinant protein secretion in *Escherichia col*i．Biotechnology Advances，2005，23：177-202．

[11] Sorensen HP，Mortensen KK．Advanced genetic strategies for recombinant protein expression in *Escherichia coli*．Journal of Biotechnology，2005，115：113-128．

[12]商永梅，包永红．类芽孢杆菌属β-葡萄糖苷酶在大肠杆菌中可溶性重组表达的优化．食品工业科技，2014，35(23)：186-190．

[12]Shang Yongmei，Bao Yonghong．Optimization of soluble expression of recombinant *Paenibacillus* sp β-glucosidase in *Escherichia coli*．Science and Technology of Food Industy，2014，35(23)：186-190．

[13]江民华，林厚民，尹金阳，等．差异柠檬酸杆菌 GXW-1β-葡萄糖苷酶的酶学性质及分子改造．微生物学报，2017，57(3)：

363-374.

[13]Jiang Minhua，Lin Houmin，Yin Jinyang，et al. Characterization and molecular modification of β-glucosidase from *Citrobacter koser* GXW-1. Acta Microbiologica Sinica，2017，57(3)：363-374.

[14]李娟，汤斌，李松，等. 匍枝根霉β-葡萄糖苷酶 BGLIII 关键位点的结构功能. 食品与发酵工业，2015，41(2)：1-6.

[14]Li Juan，Tang Bin，Li Song，et al. Structure and function of the key site of β-glucosidase BGLIII from *Rhizopus stolonifer*. Food and Fermentation Industries，2015，41(2)：1-6.

[15]闫青. 黑曲霉耐热β-葡萄糖苷酶的分离纯化及结构分析. 秦皇岛：河北科技师范学院，2016.

[15]Yan Qing . Isolation,Purification and Structure Characterization of Thermal Resistant β-glucosidase of *Aspergillus niger*. Qinghuangdao：Hebei Normal University of Science and Technology，2016.

[16]钱利纯. 高效水解大豆异黄酮β-葡萄糖苷酶及其对肉公鸡生产性能的影响研究. 杭州：浙江大学，2008.

[16]Qian Lichun. The hydrolyzing efficiency of isoflavone by β-glucosidase and effect of the enzyme on the growth performance of male broiler. Hangzhou：Zhejiang University，2008.

[17]赵云，刘伟丰，毛爱军，等. 多粘芽孢杆菌（*Bacillus polymyxa*）-葡萄糖苷酶基因在大肠杆菌中的表达，纯化及酶学性质分析. 生物工程学报，2004，20(5)：741-744.

[17]Zhao Yun， Liu Weifeng， Mao Aijun， et al . Expression， Purification and Enzymatic Characterization of *Bacillus polymyxa*β-glucosidase Gene(bglA)in *Escherichia coli*. Chinese Journal of Biotechnology，2004，20(5)：741-744.

[18]Maekawa A， Hayase M， Yubisui T， et al . A cDNA cloned from *Physarum polycephalum*,encodes new type of family 3 β–glucosidase that is a fusion protein containing a calx-β motif. The International Journal of Biochemistry and Cell Biology，2006, 38(12)：2164−2172.